ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DES FLUORESZENZ-TREPONEMEN-ANTIKÖRPER-NACHWEISES IM LIQUOR CEREBROSPINALIS DURCH BLUT-BEIMENGUNGEN

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Hans-Jürgen Thiemeyer

Saarbrücken

1973

Aus der Abteilung "Zentrallaboratorium und Blutbank"
des Städtischen Krankenhauses Kaiserslautern
(Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus GREGORCZYK)

ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DES FLUORESZENZ-TREPONEMEN-ANTIKÖRPER-NACHWEISES IM LIQUOR CEREBROSPINALIS DURCH BLUTBEIMENGUNGEN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1973

vorgelegt von
Hans-Jürgen Thiemeyer, geb. 3o.11.1937 in Bonn

DEKAN: Professor Dr. med. H. KULENKAMPFF
REFERENT: Professor Dr. med. K. GREGORCZYK

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mündliche Promotionsprüfung am 14. Mai 1973

INHALT

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. FRAGESTELLUNG	5
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND DEREN DURCHFÜHRUNG	8
1. Untersuchungsmaterial	8
2. Technische Ausrüstung	9
3. Experimentelle Methodik	11
D. ERGEBNISSE DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN	18
1. Ausfall des Liquor-FTA-Tests bei quantitativ abgestuften Zugaben von antikörperhaltigem Serum	18
2. Ausfall des Liquor-FTA-Tests bei quantitativ abgestuften Zugaben von antikörperhaltigem EDTA-Blut	22
E. DISKUSSION DER ERMITTELTEN RESULTATE	25
F. ZUSAMMENFASSUNG	3o
G. LITERATUR	32

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547310_0048

A. EINLEITUNG

Die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis (L.c.) bei erworbener und angeborener Syphilis erfolgt sowohl mit diagnostischer wie auch prognostischer Zielsetzung: Durch den erhobenen Liquor-Befund sollen eine Beteiligung des Zentralnervensystems (ZNS) ausgeschlossen oder nachgewiesen, gegebenenfalls gleichzeitig Art und Ausmaß dieses organluischen Geschehens abgegrenzt und schließlich der Effekt therapeutischer Maßnahmen bereits während, vor allem aber nach ihrer Durchführung kontrolliert werden.

Die für diese Zielsetzung zur Verfügung stehenden und vielfach auch routinemäßig angewandten Verfahren der Liquor-Untersuchung können grundsätzlich in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die eine von ihnen umfaßt - neben der Bestimmung von Zellzahlen und -art sowie der Ermittlung des Liquor-Zucker- und Gesamteiweißgehalts - qualitative und quantitative Methoden zur Erfassung beziehungsweise Darstellung des Anteils einzelner oder mehrerer Eiweißfraktionen. Zu diesen Verfahren gehören die Reaktionen nach NONNE-APELT und nach PANDY, die sogenannten Kolloidreaktionen mit Goldsol und Mastix, die elektrophoretische Eiweißfraktionierung und seit wenigen Jahren auch quantitative Immunglobulin-Bestimmungen durch Elektrophorese- und Diffusions-Verfahren (HEITMANN, MARTINA u. PIPPIONE, PIPPIONE u. Mitarb., SARTORIS u. Mitarb.).

Dieser Gruppe von Untersuchungsmethoden ist gemeinsam, daß sie zwar eine Abgrenzung zwischen primär-akuten Entzündungsvorgängen und sekundär-reaktiven Veränderungen im Bereich des ZNS- unter Umständen auch in ihrem Ausmaß - ermöglichen, jedoch durch die mit ihnen erfaßten Werte ein in diesem Bereich vorliegendes syphilitisches Geschehen weder ausgeschlossen noch bewiesen werden kann. Hierzu bedarf es der zweiten Gruppe der Liquor-Untersuchungen, zu denen sowohl die "klassischen" Komplementbindungs- und Flockungsreaktionen der Lues-Serologie (in der für Liquorproben anzuwendenden Untersuchungstechnik) wie auch die sogenannten Treponemen-Reaktionen gehören.

Durch die klassischen, das heißt mit Lipoid-Antigenen durchgeführten Komplementbindungs-, Makro- und Mikroflockungs-Reaktionen werden sogenannte Autoantikörper erfaßt, die heute allgemein als Reagine bezeichnet werden. Ihr Auftreten im L.c. ist in einem hohen, wenn auch begrenzten Maße charakteristisch für einen am ZNS lokalisierten luischen Prozeß, so daß ihr Nachweis als eine durchaus weiterführende diagnostische Maßnahme gewertet werden kann. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß diese Reagine weder in ihrem Verhalten noch in ihrer Struktur die entscheidenden Eigenschaften spezifischer Antikörper aufweisen. Den Untersuchungsverfahren zum Reaginnachweis haftet daher trotz aller Fortschritte bei ihrer bisherigen Weiterentwicklung auch weiterhin

der Mangel an, daß sie einerseits selbst bei syphilitischen Organmanifestationen nicht reaktive Resultate und andererseits bei nichtsyphilitischen Krankheitsformen - insbesondere wenn diese mit vermehrtem Zellzerfall einhergehen - reaktive Testergebnisse zeigen.

Aufgrund dieses Mangels der Lipoid-Reaktionen wird es heute für unerläßlich angesehen, in die Untersuchung des L.c. von Syphilitikern den Nachweis beziehungsweise Ausschluß erregerspezifischer Antikörper einzubeziehen. Von den hierfür zur Verfügung stehenden Verfahren, bei denen als Antigen lebende oder abgetötete Treponemata pallida Verwendung finden, werden für routinemäßige Liquor-Untersuchungen entweder der Treponema pallidum-Immobilisierungs (TPI)-Test oder der Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper (FTA)-Test - dieser auch mit zusätzlicher Absorption von gegebenenfalls vorhandenen, in höherer Konzentration die Spezifität mindernden Reaginen als FTA-ABS-Test - herangezogen.

Hinsichtlich der Spezifität werden diese Treponemen-Reaktionen insgesamt als etwa gleichwertig beurteilt, doch wird den fluoreszenzoptischen Nachweisverfahren eine deutlich höhere Sensibilität zuerkannt (HARRIS et al., FRIBOURG-BLANC u. NIEL, GREGORCZYK u.a.). Aufgrund dieses Sensibilitätsgrades, dessen Beeinträchtigung durch das beim FTA-ABS-Test vorzunehmende

Absorptionsverfahren zwar nicht generell (GARNER u. BACKHOUSE), nach den Untersuchungen von ESCOBAR, DALTON u. ALLISON jedoch grundsätzlich in Betracht gezogen werden muß, kann der FTA-Test als das für Liquor-Untersuchungen besonders geeignete Verfahren zum Ausschluß oder Nachweis treponemen-spezifischer Antikörper angesehen werden.

Da mit dem FTA-Test trotz des niedrigen Eiweißgehaltes des L.c. selbst in höheren Verdünnungen noch die für einen positiven Reaktionsausfall erforderlichen Mengen von Gamma-Globulinen (als Träger der spezifischen Antikörperfunktion) erfaßt werden, ermöglicht die Anwendung dieses Untersuchungsverfahrens - vor allem auch aufgrund der gegenüber dem TPI-Test wesentlich unkomplizierteren Technik - außerdem einen besonders bei Verlaufskontrollen notwendigen quantitativen Antikörpernachweis im Liquor. Darüber hinaus erlaubt ein Negativ-Werden und -Bleiben des FTA-Tests bei Untersuchungen des L.c. nach therapeutischen Maßnahmen eine mit den Resultaten des TPI-Tests erst wesentlich später oder gegebenenfalls überhaupt nicht mögliche prognostische Aussage.

B. FRAGESTELLUNG

Der zur Untersuchung benötigte L.c. wird entweder durch Lumbal- oder Suboccipitalpunktion gewonnen. Die einwandfreie Entnahme ist weitgehend von Erfahrung und technischem Geschick des Punktierenden sowie gegebenenfalls auch von den anatomischen Gegebenheiten beim Patienten abhängig. Doch selbst bei subtilster Technik wird es sich nicht immer vermeiden lassen, daß mit dem vorzunehmenden Einstich geringe Mengen von Blut und damit von antikörperhaltigen Eiweißfraktionen in die Liquorprobe gelangen und als nicht mehr zu beseitigende Beimengungen in den weiteren Untersuchungsgang zwangsläufig einbezogen sind. Nach SOLOMON ist damit zu rechnen, daß etwa 1o % aller Liquorpunktate Blutbeimengungen enthalten und damit Untersuchungsresultate aufweisen können, die nicht oder nur unter Vorbehalt zu verwerten sind.

Über die Möglichkeit der Beeinflussung des Reagin-Nachweises im Liquor durch Blutbeimengungen sind bereits zwischen 193o und 1934 Untersuchungen zunächst mit der WASSERMANN'schen Komplement-Bindungs-Reaktion (KAFKA, STALDER u. STREHLER, JAHNEL) und später mit dem KAHN-Test (LOVEMAN u. STOCKING) durchgeführt worden. Erst in jüngster Zeit (1971) haben IZZAT, BARTRUFF, GLICKSMAN, HOLDER u. KNOX die Abhängigkeit des Reagin-Nachweises mit dem VDRL (Cardiolipin-Mikroflockungs)-Test

im Liquor von unterschiedlichen Blut- und Serumbeimengungen unter gleichzeitiger Berücksichtigung der jeweiligen Reagin-Titer in den zugefügten Proben untersucht. Über die Beeinträchtigung treponemenspezifischer Nachweis-Methoden im Liquor durch Blutbeimengungen sind jedoch bisher noch keine Untersuchungen veröffentlicht worden.

Es erhebt sich somit die Frage, ob solche iatrogenen Blutbeimengungen das Ergebnis der heute zur Verfügung stehenden sehr sensiblen Antikörper-Nachweise im Liquor beeinflussen können und wie hoch gegebenenfalls der Schwellenwert ist, der irreführende Resultate auszulösen vermag. Wenn eine Beeinflussung in Abhängigkeit von der Größe der Blut- beziehungsweise Serumbeimengungen und gleichzeitig von der Höhe des jeweiligen Antikörpergehalts nachweisbar ist, wäre die Frage zu diskutieren, ob und bis zu welchem Ausmaß derartige Beimengungen zu Liquorproben bei angestrebten Antikörper-Nachweisen toleriert werden dürfen, wie weit dabei der Antikörper-Titer im Serum zu berücksichtigen ist und ob gegebenenfalls methodische Änderungen des Untersuchungsverfahrens - zum Beispiel Anwendung einer höheren, bis heute übrigens nicht einheitlich festgelegten sogenannten Arbeitsverdünnung des L.c. im FTA-Test - prophylaktisch anwendbar sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen daher erstmals die Möglichkeiten und das Ausmaß einer Beeinflussung des treponemenspezifischen und sehr sensiblen FTA-Tests im L.c. experimentell durch abgestuft dosierte Zugaben von Blut und Serum mit unterschiedlichem Antikörpergehalt zu antikörperfreien Liquorproben untersucht und die mit zwei Arbeitsverdünnungen ermittelten Test-Resultate einander gegenübergestellt und eingehend diskutiert werden.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND DEREN DURCHFÜHRUNG

1. Untersuchungsmaterial

Die durch Lumbalpunktion gewonnenen Proben von L i q u o r c e r e b r o s p i n a l i s , deren Entnahme aufgrund klinisch-diagnostischer Fragestellungen erfolgte, wurden zunächst mit den bei einem sogenannten "Liquor-Status" üblichen Verfahren untersucht. Diejenigen Proben, die keine pathologischen Eiweiß- und Zuckerwerte, keine Erhöhung der Zellzahl, keinen positiven bakteriologischen Befund aufwiesen, die keine reaktiven Resultate in den klassischen Lues-Reaktionen (VDRL-Test, MKR II und KBR mit Cardiolipin-Antigen) auslösten und deren Untersuchung mit dem FTA-Test negativ ausfiel, wurden unter sterilen Bedingungen in verschlossenen Reagenzgläsern eingefroren und bis zur späteren Verwendung bei - 27° C aufbewahrt.

Die antikörperhaltigen S e r a von Luikern, bei deren Auswahl das jeweilige Stadium der Syphilis unberücksichtigt blieb, wurden nach quantitativer Untersuchung mit dem FTA-Test als Einzelportionen - gekennzeichnet gemäß den zuvor ermittelten Titern von 1 : 2oo, 1 : 8oo, 1 : 16oo, 1 : 32oo und 1 : 64oo - unter den gleichen Bedingungen wie die Liquor-Proben eingefroren und bis zur vorgesehenen weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die V o l l b l u t - Proben von Luikern, deren Auswahl nach den zuvor mit ihrem Serum im quantitativ durchgeführten FTA-Test ermittelten Titern erfolgte, wurden mit EDTA (Ethylendiamintetracet-essigsaures Natriumsalz) enthaltenden Monovetten (SARSTEDT) intravenös entnommen und unmittelbar nach der Entnahme in den am gleichen Tage angesetzten Untersuchungsreihen verwendet.

2. Technische Ausrüstung

Für die fluoreszenz-optischen Untersuchungen wurde ein ZEISS-Forschungsmikroskop STANDARD UNIVERSAL mit Fluoreszenz-Einrichtung in folgender Zusammenstellung benutzt: Quecksilber-Höchstdrucklampe OSRAM HBO 2oo W, Erregerfilter UG 5 (23 x 3), Rotdämpfungsfilter BG 38 (32 x 2,5), Achromatisch-aplanatischer Phako-Fluoreszenz-Kondensor, Planachromat 63/o,9o - o.D., Sperrfilter 5o, Tubuskopf mit OPTOVAR-Vergrößerungsstufe 1,25 und binokularem Schrägtubus unter Verwendung von Kpl-Weitwinkel-Okularen (1o x Br.). Die weitere technische Ausrüstung bestand aus einem Rotationsgerät (mit eingestellter Rotationsgeschwindigkeit von 1oo rpm in einer Ebene), mehreren als feuchte Kammern eingerichteten Instrumentenschalen, Objektträgern (o,6 - o,8 mm Glasstärke) mit jeweils zwei kreisförmigen, durch Einschliff abgegrenzten Feldern

von circa 1,5 cm Durchmesser, Glas-Färbekuvetten mit Metalleinsätzen, Milliliterpipetten (1,o/o,o1 ml), HAMILTON-Mikroliterspritzen Nr. 7oo5 (o,oo5/o,ooooo5 ml) sowie neben allgemein üblichem Laborgerät (Reagenzgläser, Wasserbad, Zentrifuge u.ä.) einem Technicon-SMA 7A-Autoanalyzer.

Die für die Durchführung des FTA-Tests erforderlichen lyophilisierten Treponemata pallida (NICHOLS-Stamm), das mit Fluorescein-isothiocyanat markierte (von Ziegen gewonnene) Anti-Human-Globulin, die Kochsalz-Phosphat-Pufferlösungen (pH 7,2) ohne und mit 2 %igem TWEEN 8o-Zusatz sowie die standardisierten positiven (++++) und negativen (Ø) Kontrollsera wurden als handelsübliche FTA-Test-Reagenzien von den Baltimore Biological Laboratories (USA) bezogen und entsprechend der vom Hersteller angegebenen Gebrauchsanleitung angesetzt. Zur Fixierung der resuspendierten Treponemen auf den Objektträger wurde Aceton p.a. (MERCK) verwendet, während die vorbereitende Endreinigung der Objektträger durch 24stündiges Einlegen in 96 %igen unvergällten Aethylalkohol und gründliches Trockenreiben mit fettfreien Steril-Tupfern unmittelbar vor Aufbringung der Antigen-Suspension erfolgte.

3. Experimentelle Methodik

Die Ermittlung der jeweils kleinsten Menge von Serum oder Blut mit unterschiedlichem Antikörpergehalt, die als Beimengung zu einer antikörperfreien Liquorprobe bei deren Untersuchung mit dem FTA-Test ein positives Resultat auslöst, erfolgte in insgesamt vier Untersuchungs-Serien.

In der 1. Untersuchungs-Serie wurde folgende Versuchsanordnung gewählt: Die eingefrorenen Liquorproben wurden zunächst unter fließendem kalten Wasser aufgetaut und von mehreren dieser Proben ein für die gesamte Untersuchungs-Serie mengenmäßig ausreichender Liquor-Pool hergestellt. Die ebenfalls eingefrorenen antikörperhaltigen Sera wurden in gleicher Weise wie die Liquorproben aufgetaut und zusammen mit den bei allen Testreihen mitgeführten Kontrollsera unmittelbar vor der weiteren Verwendung für 3o min bei + 56° C im Wasserbad inaktiviert.

Für die erste von 6 Testreihen innerhalb der 1. Untersuchungs-Serie wurden 2o Reagenzgläser mit je o,5 ml L.c. beschickt, denen unter Verwendung der HAMILTON-Mikroliterspritze antikörperhaltiges Serum mit dem FTA-Titer 1 : 2oo in steigender Menge von o,oool bis o,oo2 ml pro Ansatz zugegeben wurde.

Nach intensiver Mischung durch Schütteln der Reagenzgläser wurden die bereits zuvor, jedoch stets am Untersuchungstage angefertigten Antigen-Präparate (o,ol ml Treponemen-Suspension pro Kreisfeld der sorgfältig entfetteten und gereinigten Objektträger mit nachfolgender Lufttrocknung bei Zimmertemperatur, Aceton-Fixierung für lo min und nochmaliger Lufttrocknung) mit jeweils o,o3 ml der einzelnen Liquor-Serum-Ansätze beschickt. Während der anschließenden Einwirkungszeit von 3o min wurden die Präparate in den als feuchte Kammern hergerichteten Instrumentenschalen bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dabei mit einer Geschwindigkeit von loo rpm in der Horizontalen rotiert. Danach folgte ein zweimaliges Waschen mit Kochsalz-Phosphatpuffer sowie eine Spülung mit Aqua bidest. für jeweils 5 min in gleichfalls bei loo rpm rotierenden Färbekuvetten. Anschließend wurde die den Objektträgern noch anhaftende überschüssige Flüssigkeit durch vorsichtiges Auflegen harten Filterpapiers entfernt und die noch nicht vollständig getrockneten Präparate pro Kreisfeld mit jeweils o,o3 ml des entsprechend angesetzten fluorescein-markierten Anti-Human-Globulins überschichtet. Nach nochmaliger Rotation in der feuchten Kammer für 3o min bei loo rpm, daran anschließendem abermaligem Waschen (2 x mit Kochsalz-Phosphatpuffer) und Spülen (1 x mit Aqua bidest.) in der zuvor beschriebenen Weise sowie erneuter Trocknung zwischen Filterpapier-Lagen wurde die Untersuchung der Prä-

parate im UV-Licht des Fluoreszenz-Mikroskops durchgeführt.

Für diesen mikroskopischen Untersuchungsgang wurden die Präparate nicht mit Deckgläsern - weder unter alleiniger Belassung der Restfeuchtigkeit noch unter Zufügung einer Glyzerin-Phosphatpuffer-Mischung - bedeckt, wie es zunächst von den Initiatoren des FTA-Test und zahlreichen Nachuntersuchern (DEACON u. FREEMAN, BOREL u. DUREL, FIFE, BRYAN, SANDERS u. MUSCHEL, NIEL u. FRIBOURG-BLANC u.a.) empfohlen wurde und auch heute noch in der Mehrzahl handelsüblicher Verfahrensanleitungen angegeben wird. Diese Modifikation, über deren Resultate in vergleichenden Untersuchungen bereits 1966 von GREGORCZYK berichtet wurde, ergab auch in den eigenen Untersuchungen außer einer Vereinfachung des Arbeitsganges eine deutlich bessere Lichtausbeute mit kontrastreicherer Treponemen-Fluoreszenz und damit eine wesentlich geringere Beeinträchtigung der Ablesung durch unvermeidliche Verunreinigung des Präparatgrundes.

Bei der Ablesung und Bewertung wurde unter Zugrundelegung des standardisierten ++++-Kontrollserums und der durch entsprechende Verdünnung angesetzten ++-Kontrolle das Untersuchungsergebnis als positiv bezeichnet, wenn das Präparat zumindest eine ++-Fluoreszenz aufwies; eine geringere oder fehlende Fluoreszenz wurde als negativer Reaktionsausfall gewertet. Die Protokollierung sämtlicher

Untersuchungsergebnisse erfolgte unter der grundsätzlichen Fragestellung, welche die kleinste der antikörperhaltigen Beimengung zu einem antikörperfreien L.c. ist, die ein positives Resultat bei der nachfolgenden Durchführung des FTA-Tests auslöst.

In der zweiten Testreihe der 1. Untersuchungs-Serie wurden wiederum 2o Reagenzgläser mit jeweils o,5 ml L.c. beschickt, anschließend in abgestufter Dosierung (von o,oool bis o,oo2 ml) antikörperhaltiges Serum mit einem FTA-Titer von 1 : 4oo pro Reagenzglas zugegeben und nach Durchführung des FTA-Test-Verfahrens mit diesen Ansätzen wiederum die fluoreszenz-mikroskopische Ablesung und Bewertung vorgenommen.

Bei den folgenden 4 Testreihen mit Zugabe antikörperhaltiger Sera, deren FTA-Titer 1 : 8oo, 1 : 16oo, 1 : 32oo und 1 : 64oo betrugen, konnte eine Beschränkung auf je 8 Ansätze erfolgen, da sich aus den Untersuchungsergebnissen der vorangegangenen Reihen Rückschlüsse auf die zu erwartende Größenordnung der einen positiven FTA-Test auslösenden Serumzugabe ziehen ließen. Diese Beschränkung wie auch die Verwendung von o,5 ml L.c. pro Ansatz in allen Untersuchungsreihen erfolgte - trotz der stets erforderlichen Umrechnung der Zugabemengen auf jeweils 1,o ml L.c. bei der Auswertung der Untersuchungsergebnisse - im Hinblick auf die nicht unbegrenzt zur Verfügung stehende Zahl von antikörperfreien

und keine sonstigen pathologischen Werte aufweisenden Liquor-Proben.

Für sämtliche Testreihen der eigenen Untersuchungen wurde eine im Prinzip stets gleiche, lediglich sinngemäß abgewandelte und in den folgenden Abschnitten eingehend beschriebene Versuchsanordnung gewählt, deren Schema aus T a b e l l e 1 ersichtlich ist.

In der 2. Untersuchungs-Serie wurden aufgrund orientierender Vorversuche die antikörperhaltigen Sera in steigenden Mengen von o,oo1 bis o,o2 ml pro Liquor-Probe bei zunächst 2o und später 8 Ansätzen pro Testreihe zugegeben. Die nachfolgende Untersuchung dieser Liquor-Serum-Ansätze im FTA-Test erfolgte jedoch mit einer Arbeitsverdünnung von 1 : 1o, wie sie in der Literatur von zahlreichen Autoren (HARRIS, BOSSAK, DEACON u. BUNCH; VAISMAN u. HAMELIN; FRIBOURG-BLANC u. NIEL u.a.) angegeben, jedoch nicht einheitlich gefordert wird (ESCOBAR, DALTON u. ALLISON; GARNER u. BACKHOUSE).

In der 3. Untersuchungs-Serie wurden anstelle von antikörperhaltigen Serum-Zugaben EDTA-Blutproben, die am Tage der Untersuchung von Patienten mit unmittelbar zuvor bestimmten Serum-FTA-Titern von 1 : 2oo bis 1 : 8oo durch Venenpunktion entnommen wurden, in stei-

genden Mengen von o,oo2 bis o,oo4 ml (mit einer Differenz von o,ooo2 ml pro Ansatz) den zunächst 2o antikörperfreien Liquor-Proben der ersten 3 Testreihen zugegeben. Bei den weiteren Testreihen mit EDTA-Blut-Zugaben von Patienten mit Serum-FTA-Titern von 1 : 16oo bis 1 : 64oo konnte dann wiederum eine Reduzierung auf jeweils 8 Ansätze pro Reihe erfolgen, ohne daß dadurch die Erfassung positiver Reaktionsausfälle in Frage gestellt war. Gleichzeitig mit der mikroskopischen Auswertung der Präparate zur Erfassung der jeweils kleinsten EDTA-Blut-Menge, deren Zugabe zu einem antikörperfreien L.c. ein positives Resultat bei der Untersuchung dieser Probe im FTA-Test auslöst, wurde in den Blut-Liquor-Ansätzen die Zahl der Erythrocyten pro ml unter Verwendung des Technicon-SMA 7A-Autoanalyzers bestimmt und zusammen mit den zugehörigen FTA-Resultaten protokolliert.

In der 4. Untersuchungs-Serie wurden den jeweils 2o beziehungsweise 8 Liquor-Ansätzen pro Testreihe - wiederum aufgrund orientierender Vorversuche - EDTA-Blutproben von o,oo2 bis o,o4 ml mit einer Steigerung von o,oo2 ml pro Ansatz zugegeben. Bei der anschließenden Untersuchung der Liquor-Blut-Ansätze dieser Serie mit dem FTA-Test wurden wiederum im Gegensatz zur vorangegangenen Untersuchungs-Serie Arbeitsverdünnungen von 1 : 1o angewendet, jedoch die Erythrocyten-Zählung in den unverdünnten Ansätzen vorgenommen und deren Zahl pro ml dieser Ansätze in den tabellarischen Gegenüberstellungen angegeben.

Tabelle 1: Schema der Versuchsanordnung zur Ermittlung der ein positives Resultat des FTA-Tests auslösenden Zugabemenge antikörperhaltigen Serums zu antikörperfreiem L.c.

L.c., ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Resultat des FTA-Tests vor Serum-Zugabe	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Serum-Zugabe (FTA-Titer 1 : 1600), ml +)	0,0002	0,0003	0,0004	0,0005	0,0006	0,0007	0,0008	0,0009
Resultat des FTA-Tests mit L.c.-Serum-Gemisch (unverdünnt untersucht)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	++	++	++
Kleinste Zugabemenge, die ein positives Resultat des FTA-Tests auslöst (umgerechnet auf 1,0 ml L.c.)						0,0014		

+) Pipettierung mit HAMILTON-Mikroliterspritze Nr. 7005 (0,005/0,00005 ml)

D. ERGEBNISSE DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN

1. Ausfall des Liquor-FTA-Tests bei quantitativ abgestuften Zugaben von antikörperhaltigem Serum.

Bei der Ablesung und Auswertung der in der 1. und 2. Untersuchungs-Serie durchgeführten FTA-Tests mit insgesamt 144 Liquor-Serum-Ansätzen wurden die in T a b e l l e 2 zusammengefaßten Resultate ermittelt.

Aus dieser Gegenüberstellung geht hervor, daß bereits sehr kleine Zugabemengen von antikörperhaltigem Serum zu einem zunächst antikörperfreien L.c. ein positives Resultat des mit diesen Liquorproben durchgeführten FTA-Tests auslösen. Die in den einzelnen Testreihen unter Berücksichtigung der jeweiligen Serum-FTA-Titer ermittelten kleinsten Serum-Zugaben zu 1,o ml L.c., die ein positives Resultat verursachten, reichen von o,ooo8 ml (= o,8 Lambda) bei einem Titer von 1 : 64oo bis zu o,oo34 ml (= 3,4 Lambda) bei einem Titer von 1 : 2oo des zugefügten Serums, wenn der FTA-Test mit unverdünnten Liquor-(Serum-)Ansätzen durchgeführt wurde. Bei Verwendung eines 1 : lo verdünnten Test-Ansatzes ergab sich, daß in allen Testreihen mit unterschiedlichen antikörperhaltigen Sera insgesamt wesentlich höhere Zugaben zum antikörperfreien L.c. erforderlich waren, um ein positives FTA-Test-Resultat auszulösen. Die Größenordnung dieser Serumzugaben liegen in der

Tabelle 2: Volumina der positive FTA-Test-Resultate auslösenden Beimengungen von Syphilitiker-Serum (mit unterschiedlichen FTA-Titern) zu antikörperfreien L.c.-Proben.

Ein positives Resultat des FTA-Tests mit (zuvor) antikörperfreiem L.c. durch Serum-Zugaben wurde ermittelt

bei einem FTA-Titer des Serums	nach einer Zugabe von (ml/1,o ml L.c.)	bei Durchführung des FTA-Tests mit
von 1 : 2oo	o,oo34	unverdünntem Test-Ansatz
4oo	o,oo26	
8oo	o,oo26	
1.6oo	o,oo14	
3.2oo	o,oo1o	
6.4oo	o,oo08	
von 1 : 2oo	o,o38	1 : 1o verdünntem Test-Ansatz
4oo	o,o24	
8oo	o,o14	
1.6oo	o,o1o	
3.2oo	o,oo8	
6.4oo	o,oo6	

tabellarischen Gegenüberstellung zwischen o,oo6 ml (= 6,o Lambda) bei einem Serum-Titer von 1 : 6.4oo und o,o38 ml (= 38,o Lambda) bei einem FTA-Titer von 1 : 2oo des zugefügten Serums.

Ein Vergleich aller Resultate dieser beiden Test-Serien zeigt eine selbst bei unterschiedlicher Methodik des FTA-Tests übereinstimmende Abhängigkeit der zu einem positiven Resultat führenden Zugabemengen von ihrem Antikörpergehalt, sofern der zuvor ermittelte FTA-Titer des jeweils zugefügten Serums als quantitatives Maß für die im Serum vorhandene Antikörpermenge angesehen wird. Dieses umgekehrt proportionale Verhältnis ist auch aus der graphischen Darstellung in A b b i l d u n g 1 ersichtlich, aus der ferner hervorgeht, daß bei Verwendung von 1 : 1o verdünnten Test-Ansätzen die zur Auslösung eines positiven Resultats des Liquor-FTA-Tests erforderlichen Serumzugaben besonders bei geringem Antikörpergehalt ein Mehrfaches der im unverdünnten Test-Ansatz sich auswirkenden Beimengungen betragen.

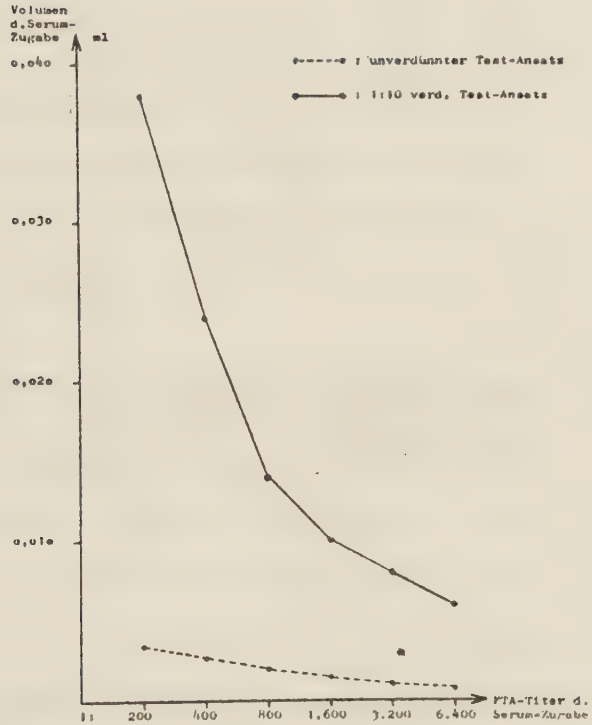

Abb. 1: Abhängigkeit der positive Resultate des Liquor-FTA-Tests auslösenden Zugabemengen antikörperhaltiger Sera von der Höhe des Serum-FTA-Titers bei Verwendung unverdünnter und 1 : 10 verdünnter Test-Ansätze.

2. Ausfall des Liquor-FTA-Tests bei quantitativ abgestuften Zugaben von antikörperhaltigem EDTA-Blut.

Die Ergebnisse der 3. und 4. Untersuchungs-Serie mit insgesamt 144 Liquor-Blut-Ansätzen, durch die ermittelt werden sollte, welche Zugabe-Volumina von unterschiedlichen antikörperhaltigen EDTA-Blutproben zu antikörperfreiem L.c. ein positives Resultat des mit diesen Ansätzen durchgeführten FTA-Tests auslösen, sind in T a b e l l e 3 zusammengefaßt.

Auch bei dieser Gegenüberstellung zeigt sich wiederum die Abhängigkeit der auslösenden Menge vom (als Serum-FTA-Titer ausgedrückten) Antikörpergehalt der Blutproben: Bei gleichmäßig steigenden Titerhöhen reichen die ein positives Test-Resultat herbeiführenden Zugaben zu 1,o ml L.c. von o,oo72 ml (= 7,2 Lambda) EDTA-Blut mit einem Serum-FTA-Titer von 1 : 2oo in deutlich geringer werdender Abstufung bis zu o,oo2 ml (= 2,o Lambda) bei einem Titer von 1 : 6.4oo, wenn die Test-Ansätze bei der Durchführung des FTA-Tests unverdünnt verwendet wurden. Bei 1 : lo verdünnten Test-Ansätzen liegen die zu positiven Resultaten des Liquor-FTA-Tests führenden EDTA-Blut-Zugaben (mit Serum-Titern von 1 : 2oo bis 1 : 6.4oo)zwischen o,o6 ml (= 6o,o Lambda) und o,o16 ml (= 16,o Lambda).

Tabelle 3: Volumina der positive FTA-Test-Resultate auslösenden Beimengungen von Syphilitiker-Blut (mit unterschiedlichen Serum-FTA-Titern) zu antikörperfreien L.c.-Proben.

Ein positives Resultat des FTA-Tests mit (zuvor) antikörperfreiem L.c. durch EDTA-Blut-Zugaben wurde ermittelt

bei einem Serum-FTA-Titer der Blutprobe	nach einer Zugabe von (ml/1,o ml L.c.)	mit einer result. Erythrocyten-Zahl pro ml L.c.-Ansatz	bei Durchführung des FTA-Tests mit
von 1 : 2oo	o,oo72	34.000	unverdünntem Test-Ansatz
4oo	o,oo56	25.000	
8oo	o,oo36	17.000	
1.6oo	o,oo28	14.000	
3.2oo	o,oo24	13.000	
6.4oo	o,oo2o	9.000	
von 1 : 2oo	o,o6o	328.000	1 : 1o verdünntem Test-Ansatz
4oo	o,o48	234.000	
8oo	o,o32	168.000	
1.6oo	o,o24	116.000	
3.2oo	o,o2o	97.000	
6.4oo	o,o16	65.000	

Die in den jeweiligen Test-Ansätzen mit EDTA-Blut-Beimengungen durchgeführten Erythrocyten-Zählungen (unter Verwendung des TECHNICON-SMA 7A-Autoanalyzers), deren Resultate gleichfalls in Tabelle 3 einander gegenübergestellt sind, bestätigen zusätzlich den Zusammenhang zwischen Antikörpergehalt und Größe einer Blutbeimengung, die in zunächst antikörperfreien L.c.-Proben bei deren Untersuchung mit dem FTA-Test ein positives Resultat auslöst. Auch aus dieser Gegenüberstellung ist ersichtlich, daß bei hohen Serum-FTA-Titern und Verwendung unverdünnter Test-Ansätze zur Durchführung des Liquor-FTA-Tests bereits sehr geringe Blut-Volumina (im Extremfall der eigenen Untersuchungen als Beimengung von 9.ooo Erythrocyten pro ml L.c. dargestellt) das Resultat dieser Untersuchung beeinflussen. Zwar zeigen die Resultate der Untersuchung mit 1 : lo verdünnten Test-Ansätzen, daß gleichfalls eine Beeinflussung des Liquor-FTA-Tests durch antikörperhaltige Blut-Beimengungen erfolgt, doch wird bei dieser Methodik ein positives Test-Resultat erst durch wesentlich größere Volumina ausgelöst.

E. DISKUSSION DER ERMITTELTEN RESULTATE

In den früheren Veröffentlichungen über die Beeinflussung der "klassischen" Reagin-Nachweise im Liquor durch Blutbeimengungen ist wiederholt die Frage erörtert worden, ob und in welcher Weise irreführende Resultate bei der Untersuchung derartiger Liquor-Proben vermieden beziehungsweise bis zu welchem Ausmaß Blutbeimengungen toleriert werden können.

Während KAFKA das ermittelte Resultat einer blutigen Liquor-Probe dann gelten ließ, wenn eine gleichgroße Blutmenge des untersuchten Patienten in einem reaginfreien Liquor eines anderen Patienten kein positives Resultat auslöste, forderten STALDER u. STREHLER grundsätzlich die Wiederholung der Lumbalpunktion, wenn eine Liquor-Probe mit einer Blutbeimengung ein positives Resultat aufwies. Erst aufgrund der späteren Untersuchungen von LOVEMAN und STOCKING sowie von IZZAT u. MITARB., die bei der quantitativen Ermittlung im L.c. auch die Höhe des Serum-Titers berücksichtigten, konnte von diesen Autoren darauf hingewiesen werden, daß selbst bei hohen Serum-Titern lediglich makroskopisch sichtbare Blutbeimengungen das Ergebnis der Liquor-Untersuchung beeinflussen.

Nach den von IZZAT u. Mitarb. ermittelten Resultaten, die auf Untersuchungen mit dem ohne Zweifel an der

Spitze der Empfindlichkeits-Skala klassischer Lues-Reaktionen stehenden VDRL-Test beruhen, ist selbst bei einem Serum-VDRL-Titer von 1 : 256 eine makroskopisch sichtbare Blutbeimengung von 0,003 ml (= 3,0 Lambda) zu antikörperfreiem L.c. erforderlich, um ein positives Resultat dieses Tests auszulösen. Von den Autoren wird daher die Ansicht vertreten, daß bei Untersuchungen zum Reagin-Nachweis im L.c. eine gegebenenfalls in einer Probe enthaltene Blutbeimengung dann unberücksichtigt bleiben kann, wenn deren Nachweis lediglich mikroskopisch möglich ist und der Serum-VDRL-Titer des Patienten nicht mehr als 1 : 256 beträgt.

In den eigenen Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß beim Nachweis beziehungsweise Ausschluß treponemenspezifischer Antikörper im Liquor mit dem FTA-Test auch antikörperhaltige Blut- und insbesondere Serum-Beimengungen unter 0,003 ml (= 3,0 Lambda) zu positiven Resultaten führen, wenn die Untersuchung bei diesem hochempfindlichen Verfahren mit unverdünnten Test-Ansätzen durchgeführt wird. Diese geringen, makroskopisch nicht sichtbaren Blutbeimengungen werden zwar erst bei höheren Serum-FTA-Titern wirksam; dennoch ist zu berücksichtigen, daß Liquor-Untersuchungen nicht nur in syphilitischen Spätstadien erfolgen, in denen diese höheren Serum-Titer in der Regel nicht vorliegen, sondern auch bei Ver-

dacht auf eine frühsyphilitische Beteiligung des ZNS mit hierbei hohen, zum Teil sogar extremen FTA-Titern im Serum des Patienten. Darüber hinaus ist in Betracht zu ziehen, daß selbst mit kleinsten, lediglich mikroskopisch nachweisbaren Blutbeimengungen auch eine schon in sehr kleinen Volumina zu positiven Resultaten des Liquor-FTA-Test führende Serum-Beimengung extravasaler Herkunft durch den Punktionsvorgang in die Liquor-Probe gelangen kann.

Aus den Resultaten der eigenen Untersuchungen ist jedoch auch ersichtlich, daß bei Durchführung des FTA-Tests mit 1 : 1o verdünnten Testansätzen wesentlich größere Serum- und vor allem Blutbeimengungen erforderlich sind, um bei der Untersuchung eines zunächst antikörperfreien L.c. ein positives Resultat auszulösen. Selbst bei einem Serum-Titer von 1 : 6.4oo führte erst eine makroskopisch unüberschbare Blutbeimengung von o,o16 ml (= 16,o Lmbda) und eine - bei der Lumbal- oder Suboccipitalpunktion sicher nicht in Betracht zu ziehende - Serumbeimengung von o,oo6 ml (= 6,o Lambda) zu einem positiven Resultat des mit dem verdünnten Liquor-Ansatz durchgeführten FTA-Tests.

Die kritische Auswertung der ermittelten Resultate ergibt somit, daß der Nachweis beziehungsweise Ausschluß treponemen-spezifischer Antikörper im L.c. mit Hilfe des

FTA-Tests zwar durch sehr kleine antikörperhaltige Serum- und Blutbeimengungen beeinflußt wird, irreführende Resultate jedoch weitgehend durch die Verwendung einer Ausgangsverdünnung von 1 : lo der zu untersuchenden Liquor-Proben vermieden werden können. Die dabei grundsätzlich in Betracht zu ziehende Möglichkeit, daß aufgrund der Verdünnung kleine Antikörpermengen nicht erfaßt werden, dürfte in der Praxis kaum gegeben sein, da bereits in früheren Mitteilungen (FRIBOURG-BLANC u. NIEL, GREGORCZYK u.a.) über umfangreiche Liquor-Untersuchungen mit dem FTA-Test darauf hingewiesen wurde, daß alle eindeutig positiven Resultate bei quantitativer Auswertung zumindest einen Titer von 1 : lo aufwiesen.

Doch auch bei der Durchführung des Liquor-FTA-Tests mit 1 : lo verdünnten Ansätzen sollten die Resultate von Liquor-Proben mit makroskopisch erkennbaren Blutbeimengungen nur dann verwertet werden, wenn das Untersuchungsergebnis negativ ausfällt. Bei einem positiven Resultat eines zwar frei von Blutbeimengungen erscheinenden, jedoch von einem Patienten mit hohem Serum-FTA-Titer stammenden L.c. dagegen dürfte es stets angebracht sein, die Probe mikroskopisch zu untersuchen und beim Nachweis auch geringerer Erythrocytenbeimengungen eine erneute Lumbal- oder Suboccipitalpunktion durchzuführen.

Eine weitgehende Beachtung der in den eigenen Untersuchungen nachgewiesenen Beeinflußbarkeit des Liquor-FTA-Tests durch Blutbeimengungen wird zwar irreführende Resultate beziehungsweise deren Fehldeutung keinesfalls ganz verhindern, jedoch ohne Zweifel dazu beitragen, daß mit Hilfe des FTA-Tests nachgewiesene treponemenspezifische Antikörper im L.c. mit größerer Sicherheit als eindeutiger Beweis für ein syphilitisches Krankheitsgeschehen am ZNS gewertet werden können.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis (L.c.) bei Verdacht auf ein syphilitisches Krankheitsgeschehen am Zentralnervensystem (ZNS) erfordert den Nachweis oder Ausschluß treponemenspezifischer Antikörper. Da der hierfür besonders geeignete Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper (FTA)-Test einen sehr hohen Sensibilitätsgrad aufweist, sollte in experimenteller Untersuchung geprüft werden, ob und in welchem Ausmaß eine Beeinflussung der Resultate durch antikörperhaltige Serum- und Blutbeimengungen erfolgt.

Aus den in mehreren Test-Serien ermittelten und tabellarisch gegenübergestellten Ergebnissen geht hervor, daß die in abgestufter Dosierung zu antikörperfreien Liquor-Proben zugefügten Serum- und Blutmengen bei der nachfolgenden Untersuchung dieser Ansätze mit dem FTA-Test positive Resultate auslösten. Dabei wiesen die jeweils kleinsten auslösenden Zugabemengen ein umgekehrt proportionales Verhältnis zu den zuvor ermittelten FTA-Titern der antikörperhaltigen Serum- und Blutproben auf.

Im Gegensatz zu vorangegangenen Mitteilungen in der Literatur über die Beeinflussung "klassischer" Lues-Reaktionen durch Blutbeimengungen im L.c. ergaben die

eigenen Untersuchungen, daß auch makroskopisch nicht sichtbare Blutbeimengungen zu positiven Resultaten des Liquor-FTA-Tests führen, wenn dessen Durchführung mit unverdünnten Test-Ansätzen erfolgt. Aufgrund dieser Ergebnisse wird es für erforderlich gehalten, bei Liquor-Untersuchungen den FTA-Test mit einer bisher nicht einheitlich empfohlenen Arbeitsverdünnung von 1 : 1o durchzuführen und die so ermittelten Resultate von L.c.-Proben nur dann zu verwerten, wenn bei makroskopisch sichtbaren Blutbeimengungen ein negativer Reaktionsausfall vorliegt.

G. LITERATUR

ESCOBAR, M.R., DALTON, H.P. and ALLISON, M.J. : Fluorescent antibody tests for syphilis using cerebrospinal fluid: clinical correlation in 15o cases. Amer. J. clin. Path. 53, 886 (197o)

FRIBOURG-BLANC, A. et NIEL, G. : Application de l'immuno-fluoréscence au diagnostic sérologique de la syphilis. Bull. Soc. franç. Derm Syph. 67, 946 (196o)

FRIBOURG-BLANC, A. et NIEL, G. : Le diagnostic sérologique de la syphilis par la technique d'immuno-fluoréscence. Presse méd. 7o, 1875 (1962)

GARNER, M.F. and BACKHOUSE, J.L. : Fluorescent treponemal antibody tests on cerebrospinal fluid. Brit. J. vener. Dis. 47, 356 (1971)

GREGORCZYK, K. : Vorkommen, Nachweis und Bedeutung fluoreszenz-optisch erfaßbarer Treponemen-Antikörper bei der Syphilis. Ärztl. Lab. 12, 253 (1966)

GROGORCZYK, K. : Demonstration of antibodies by fluorescence.
Dermatologica 133, 327 (1966)

HARRIS, A.,
BOSSAK, H.M.,
DEACON, W.E. and
BUNCH, W.L. : Comparison of the fluorescent treponemal antibody tests with other tests for cerebrospinal fluids.
Brit. J. Vener. Dis. 36, 178 (196o)

HEITMANN, H.J. : Quantitative Bestimmung der Immunglobuline (IgG) im Liquor cerebrospinalis bei der Lues mit und ohne Beteiligung des Nervensystems.
Hautarzt 23, 31 (1972)

IZZAT, N.N.,
BARTRUFF, J.K.,
GLICKSMAN, J.M.,
HOLDER, W.R. and
KNOX, J.M. : Validity of the VDRL test on cerebrospinal fluid contaminated with blood.
Brit. J. vener. Dis. 47, 162 (1971)

JAHNEL, F. : Über unspezifische und fälschlich positive Luesreaktionen im Liquor.
Nervenarzt 22, 361 (1951)

KAFKA, V. : Theorie und Technik der Liquoruntersuchung mit besonderer Berücksichtigung der Syphilis. In Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten v. J. JADASSOHN, XVII/1, 513. Springer-Verlag Berlin 1929

LOVEMAN, A.B. and STOCKING, L. : Kahn reaction with spinal fluids containing varying amounts of syphilitic blood. Arch. Derm. Syph. (Chicago) 29, 653 (1934)

MARTINA, G. e PIPPIONE, M. : Studio quantitativo sulle immunoglobuline nel liquor di neuroluetici. Minerva derm. (Torino) 46, 322 (1971)

PIPPIONE, M., MARTINA, G. e SARTORIS, S. : Immunoelettroforese (I.E.F.) su liquor di neuroluetici. Minerva derm. (Torino) 46, 323 (1971)

SARTORIS, G., STRANI, F. e PIPPIONE, M. : FTA test nella neurolue; studi immunologici con antiglobuline frazionate fluorescenti nel siero e nel liquor. Minerva derm. (Torino) 46, 33o (1971)

SOLOMON, P. : New Engl. J. Med. 212, 55 (1935).
Zit. n.: IZZAT u.a.:
Validity of the VDRL test on cerebrospinal fluid contaminated with blood.
Brit. J. vener. Dis. 47, 162 (1971)

STALDER, W. u.
STREHLER, W. : Experimentelle Studien über die Beurteilung der Wassermannschen Reaktion des bluthaltigen Liquors.
Schweiz. med. Wschr. 13, 752 (1932)

VAISMAN, A. et
HAMELIN, A. : Application au diagnostic sérologique de la syphilis de la méthode d'immuno-fluorescence.
Presse méd. 69, 1157 (1961)

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Klaus GREGORCZYK
für die freundliche Überlassung des Themas dieser
Arbeit und für seine stets hilfsbereite Unterstützung
in allen Fragen.

LEBENSLAUF

Am 3o. 11. 1937 wurde ich, Hans-Jürgen Thiemeyer, als einziges Kind des Zahnarztes Dr. med. dent. Fritz Thiemeyer und seiner Ehefrau Dr. med. dent. Anneliese, geb. Merbecks, in Bonn geboren.

1945 wurde ich in Wuppertal-Ronsdorf eingeschult. Nach dreijähriger Volksschulzeit besuchte ich bis 1958 das Neusprachliche humanistische Gymnasium in Wuppertal-Barmen. Nach Abschluß der Reifeprüfung studierte ich in Bonn Zahnheilkunde. Am 9. 2. 1966 erhielt ich dort, nach bestandenem zahnärztlichen Staatsexamen, meine Bestallung als Zahnarzt.

Seit Februar 1966 bin ich in der elterlichen Zahnarztpraxis in Wuppertal als zahnärztlicher Assistent tätig.